

ITS 克隆测序揭示中国沿海表层水中 真核浮游生物多样性

于淑贤^{1,2}, 李文军^{1,2}, 李楠³, 李富超⁴, 王寅初¹, 李佳霖¹, 秦松^{1*}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所海岸带生物与生物资源利用所重点实验室, 山东烟台 264003;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 广西师范学院北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西南宁 530001;
4. 中国科学院海洋研究所科研处, 山东青岛 266071)

摘要:表层水体中的浮游生物群落在生物地球化学过程中起重要作用,其生物地理分布通常与水文等环境条件相关。近年来 DNA 测序等方法已成为研究海洋生态系统中真核生物群落的重要工具,在本研究中采用 ITS1 作为 DNA 标记评估我国沿海表层水中的真核浮游生物多样性。BLAST 结果表明,大部分 ITS1 序列隶属于 6 个真核类群,包括浮游动物、真菌和囊泡虫类等。这些主要的真核生物类群可以将采样点分为显著不同的 5 个聚类,而每个聚类中的特征真核生物门类表现出显著的地理分布差异。总体上,真核浮游生物群落的多样性水平与经纬度、水深、温盐等参数显著相关,自北向南有显著升高的趋势。真核生物群落差异(β -多样性)随地理距离的增加而加大。这提示真核浮游生物在我国沿海表层水中显示出地理限制。本文为中国沿海浮游生物的生物地理研究提供了分子生物学数据基础。

关键词:真核浮游生物;中国沿海;ITS;生物多样性

中图分类号:X17A

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2018)01-0108-09

doi:10.3969/j.issn.1671-6447.2018.01.010

海岸带是全球生物地球化学过程的重要区域,以约 12% 世界地表面积生产约 25% 的全球初级生产力^[1-2]。作为过渡区域,海岸带受到陆地和海洋过程之间强烈的相互作用,因而导致沿海各区域物理和生态结构的异质性^[2]。我国海岸带的沿海水体相互连通,维持了异质区域之间的物质和能量交换。展开跨海区大范围的浮游生物研究将有助于形成对中国海岸带生态环境的整体认识。迄今,在各单独海域已有丰富的海洋生物调查研究^[3-5],然而跨海区的大范围浮游生物研究却鲜有报道。

在阳光照射的表层水体中,浮游生物群落包括在初级生产和生物地球化学过程中起重要作用的组成类群^[6]。浮游生物除了依靠自身有限的运动能力,更多的是随波逐流地分散在海洋表层,其生物地理分布随着海流的方向和强度变化而改变,因而通常与大洋环流体系或较大水团的分布相一致^[7]。在研究浮游生物的生物地理分布时,应综合考虑群落组成、区系发展历史以及环境条件,以此可以反映海域内的浮游生物区系特点和分布界限。近年,DNA 测序等非培养的研究方法为海洋真核浮游生物的生态学研究提供了有力的工具^[6]。在针对真核生物群落的研究中,核糖体基因内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer,ITS)是常见的通用基因标记。目前,ITS 作为“条形码”已经应用于藻类、真菌、原生生物、植物和动物的种属关系鉴定,然而其在环境群落中鉴定科以上分类的能力有限^[8]。据报道,以 ITS 的可变区域 ITS1 为分类标记研究自然生物群落中的真核物种具有更高的效率^[9]。本文基于克隆文库的方法调查中国沿海真核浮游生物的群落

收稿日期:2017-03-13

资助项目:中国科学院战略试点项目——热带西太平洋海洋系统物质能量交换及其影响(XDA1102040300);国家自然科学基金项目——海洋藻红蛋白适应弱光的分子机制(41176144)和高光和氮缺乏胁迫下十个雨生红球藻虾青素合成相关基因顺式作用元件的协同作用(41376139)

作者简介:于淑贤(1987-),女,山东烟台人,博士研究生,主要从事海洋微生物分子生态学方面研究。E-mail: sxxy@yic.ac.cn

* **通讯作者:**秦松(1968-),男,山东掖县人,研究员,博士,主要从事分子藻类学方面研究。E-mail: cpqa_yic@sina.com

(王佳实 编辑)

组成和结构,并以 ITS1 为序列标记分析浮游生物多样性,为沿海表层水中真核浮游生物群落的遗传多样性提供基础数据和参考资料。

1 材料与方法

1.1 采 样

自 2007-08—09 进行的南海北部开放航次和中国沿海水域开放航次中,分别取得 33 个位点(NS1~NS33)和 34 个位点(S11~S55)的水体样本(图 1)。在每个采样点,通过 Niskin 采水器于水下 5 m 处收集 2 L 表层水,随后采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。所得滤膜迅速冷冻储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻,以备提取 DNA。同时,由温盐深仪(Conductivity Temperature Depth,CTD)测得温度、盐度和水深参数。经探测,水深超过 1 000 m 的深水位点均位于南海北部,包括 S47~S54,NS12~NS26 及 NS29~NS31。

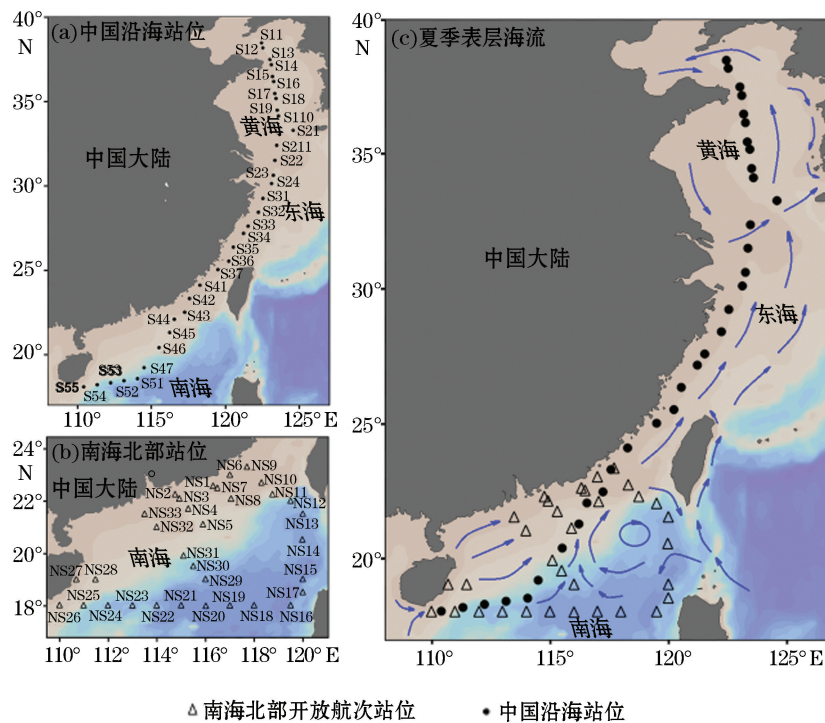


图 1 采样位点分布及夏季表层海流示意图^[10-12]

Fig.1 Maps of sampling sites and surface circulation in summer^[10-12]

1.2 总 DNA 提取和 ITS 片段扩增

按照标准苯酚-氯仿提取过程对 67 个滤膜样本进行总 DNA 提取^[13]。沉淀的 DNA 用 RNase 处理后,进行 2 次 70%乙醇冲洗,并以 TE 缓冲液溶解备用。

参照高远等^[14]的方法,本研究采用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[15]对 ITS 基因进行 PCR 扩增以获得包含 ITS1 的目的基因片段。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,62 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,30 次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。使用 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,并用 Biotek 凝胶提取试剂盒(Biotek Corporation,北京)纯化目标条带。将纯化的 DNA 片段连接到 pGEM-T easy 载体系统(Promega,美国),随

后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从每个克隆文库中随机挑取 100 单菌落,在国家人类基因组研究中心(上海)进行 ABI 3730 测序。

1.3 序列分析

原始序列按照以下条件剔除不合格序列:1)序列长度小于 200 bp;2)短片段重复;3)连续 8 个以上同聚碱基。本文共获得 5 796 条 ITS 序列,提交至 GenBank 数据库,编号为 KJ179957~KJ182930, KX11659~KX115389, KU163659~KU164795。首先使用 ITSx^[16] 从 ITS 序列中提取 ITS1 可变区,剔除其中序列长度小于 200 bp 的 ITS1 序列。随后使用 MAFFT^[17] 对 ITS1 多序列进行比对,并使用 phyML 3.0^[18] 以 GTR+G+I 模型构建最大似然树(bootstrap 1000)。对齐的 ITS1 序列由 DOTUR^[19] 基于 0.03 的分类差异归类为操作分类单元(OTU),其中每个 OTU 的代表序列通过 BLAST 匹配至亲缘关系最近的参考序列(相似度 \geq 97%),而最大似然树则为 Mothur 软件计算 weighted UniFrac 群落差异矩阵(即 β -多样性)提供依据。另外,使用 Mothur 软件完成对克隆文库的统计分析,包括覆盖度(Good's coverage)、丰富度指数(Chao1 estimator)和多样性指标(Shannon-Wiener)^[20]。最后,地理参数和物理参数之间、各参数与主要门类的相对丰度之间、各参数与 α -多样性指数之间的 Spearman 相关性分析,以及位点各参数的欧氏距离、地离距离与 β -多样性的相关性检验(Mantel tests)和偏相关检验(partial Mantel tests)均使用 R 软件完成,并输出相关系数(R)及概率值(P)^[21-22]。

2 结 果

2.1 物理参数与地理参数的相关性

本文采集的 67 个位点(图 1)跨越了黄海、东海、台湾海峡和南海北部的大范围沿岸海域,其物理条件和地理条件有着较大的异质性:经度变化范围为 110 $^{\circ}$ 00'00" \sim 124 $^{\circ}$ 35'24"E,纬度变化范围为 17 $^{\circ}$ 58'48" \sim 38 $^{\circ}$ 27'00"E,深度变化范围为 25~4 036 m,温度变化范围为 21.69~29.54 $^{\circ}$ C,盐度变化范围为 30.03~34.06。由表 1 可见,在自北向南的方向上,伴随着以下条件变化:1)纬度降低,经度数值减小;2)海域水深增加;3)水体表层温度增加,盐度增加。

表 1 地理参数和物理参数的相关性

Table 1 Spearman's correlations between geographic and physical variables

参 数	经 度		纬 度		水 深		温 度		盐 度	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
经度	1.00	< 0.01	0.81	< 0.01	-0.39	< 0.01	-0.57	< 0.01	-0.50	< 0.01
纬度	0.81	< 0.01	1.00	< 0.01	-0.74	< 0.01	-0.86	< 0.01	-0.68	< 0.01
水深	-0.39	< 0.01	-0.74	< 0.01	1.00	< 0.01	0.77	< 0.01	0.52	< 0.01
温度	-0.57	< 0.01	-0.86	< 0.01	0.77	< 0.01	1.00	< 0.01	0.71	< 0.01
盐度	-0.50	< 0.01	-0.68	< 0.01	0.52	< 0.01	0.71	< 0.01	1.00	< 0.01

2.2 序列统计分析

从 67 个克隆文库中,共获得 5 796 条 ITS 序列。经 ITSx 程序提取 ITS1、除去长度小于 200 bp 的序列后,得到 5 570 条 ITS1 序列。随后,应用 DOTUR 将 ITS1 序列归类至 857 个 OTU(差异度 3%)。统计结果显示,平均每个克隆文库得到 84 条序列,覆盖度达到 77%,丰富度指数均值为 79,以及多样性指数均值为 3。

2.3 真核浮游生物群落组成

BLAST 检索结果显示,ITS1 序列主要来自 6 个真核生物类群:包括浮游动物(2 883 条序列, 51.8%)、真菌(1 795 条序列,32.2%)、囊泡虫类(796 条序列,14.3%)、不等鞭毛类(37 条序列, 0.7%)、有孔虫(32 条序列,0.6%)和植物(26 条序列,0.5%)。如图 2 所示,浮游动物的主要门类是刺胞动物门、毛颚动物门、栉水母门、节肢动物门和脊索动物门;真菌大部分归属于子囊菌门、担子菌门和未归类真菌;囊泡虫类主要包括纤毛虫门和甲藻门。这些主要的真核生物门类在各个文库中的相对丰度能够将所有位点分为 5 个类别,即 Cluster I~Cluster V(图 3)。其中,Cluster I 的优势类群是担子菌门和未归类真菌,分布于黄海北部海域、东海及南海北部的近岸位点;刺胞动物门(主要是双生水母和五角水母)是 Cluster II 的优势门类,主要分布于黄海南部、台湾海峡、南海北部的近岸位点及少数深水位点(水深 > 1 000 m);Cluster III 以子囊菌门为优势类群,集中分布于南海北部的近岸位点;Cluster IV 的优势类群包括纤毛虫门、甲藻门和褐藻门,分布于南海北部的深水位点;Cluster V 包括南海北部的位点 NS9、NS26 和 S52,主要优势门类是毛颚动物门。如图 4 所示,五大类别的特征门类均与物理参数、地理参数有显著相关关系($P < 0.05$)。来自 Cluster I~Cluster III 的特征门类与经度、纬度有着显著的正相关关系($P < 0.05$),与水深、温度、盐度有着显著的负相关($P < 0.05$);而 Cluster IV~Cluster V 的特征门类则呈现与经度、纬度的显著负相关关系($P < 0.05$),与水深、温度、盐度的显著正相关关系($P < 0.05$)。

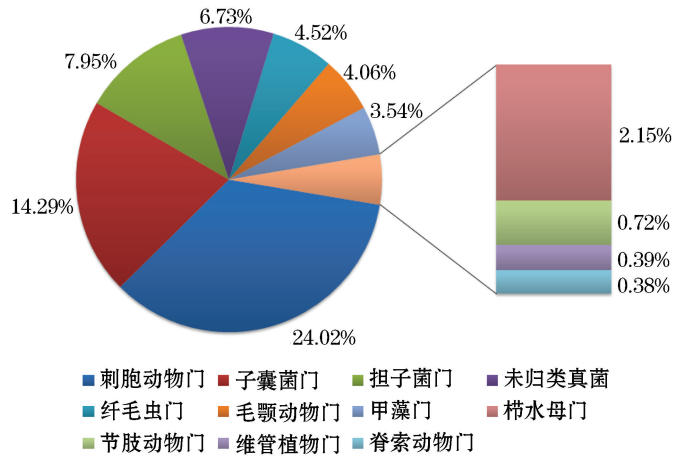
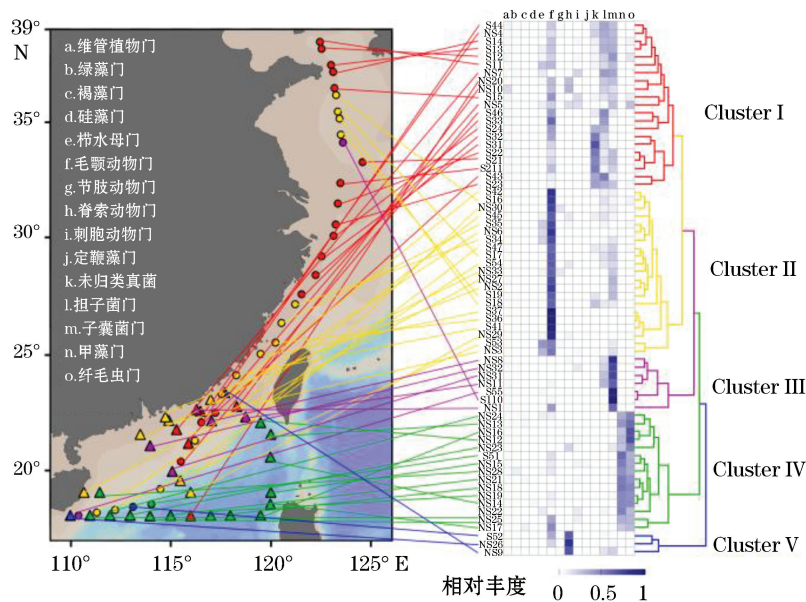


图 2 归类于各真核生物门类的序列在 ITS1 序列总数中的比例
Fig.2 Proportion of the sequences belonging to major eukaryotic phyla in the total ITS1 sequences



注: 热图显示真核门类在各位点的相对丰度

图 3 真核生物的主要门类将位点分为 5 个类别

Fig.3 Major eukaryotic phyla classify all sites into five clusters
Heatmap exhibits relative abundance of major eukaryotic phyla in each site



注:图中以色调图例标注相关系数;以*标注显著相关关系($P < 0.05$)

图4 来自5个类别的特征门类与物理参数、地理参数的相关性

Fig.4 Spearman's correlations between discriminant phyla of five clusters and physical, geographic variables

2.4 真核浮游生物多样性与物理参数、地理参数的相关性

Spearman 相关性分析结果(表 2)显示,丰富度指数和多样性指数均与纬度、水深和温度有显著相关性 ($P < 0.05$)。丰富度指数和多样性指数随纬度增加而降低,随水深、温度升高而升高。这提示真核浮游生物群落的 α -多样性在中国沿海存在自北向南的升高趋势。对于 β -多样性而言,地理距离和水深显然是最为重要的影响因素,均与群落差异有着显著的正相关关系(表 3)。这提示地理距离越远,真核浮游生物群落的相似性越小;随着水深差异增加,真核浮游生物群落的差异也随之增加。

表 2 α -多样性指数与物理参数、地理参数的相关性

Table 2 Spearman's correlations between α -diversity index and the physical, geographical variables

参 数	丰富度指数		多样性指数	
	R	P	R	P
经度	-0.09	0.47	-0.11	0.37
纬度	-0.34	0.01	-0.34	0.01
水深	0.55	< 0.01	0.53	< 0.01
温度	0.39	< 0.01	0.38	< 0.01
盐度	0.18	0.16	0.21	0.09

表 3 β -多样性与各参数的相关性检验和偏相关检验

Table 3 Mantel and partial Mantel tests between physical variables, geographic distance and β -diversity distance

参 数	相关性检验		控制参数	偏相关性检验	
	R	P		R	P
经度	0.056	0.077	地理距离	0.043	0.137
纬度	0.080	0.072	地理距离	0.080	0.073
水深	0.265	0.001	地理距离	0.206	0.002
温度	0.042	0.189	地理距离	0.035	0.230
盐度	-0.032	0.669	地理距离	-0.020	0.592
地理距离	0.210	0.001	水深	0.125	0.014

3 讨 论

在序列丰度上占优势的主要门类能够将所有采样位点分为明显不同的五大类,其中位于黄海、东海及台湾海峡的采样点均归类到 Cluster I 和 Cluster II 中,南海北部深水位点自成一类(Cluster IV),而归类情况最为复杂的是南海北部的沿海位点,分属于 Cluster I~Cluster III。这表明沿海各海域的真核浮游生物类群组成有着显著的差异。真核浮游生物在南海北部沿海产生这种复杂的分类,可能与其复杂的水文条件有关。每年夏季,表层水的环流体系受到极为复杂的上升流、沿海潮流和气旋涡流等水文条件的影响而产生强烈混合^[23]。此外,珠江向沿海注入大量淡水和营养盐,在南海北部形成复杂的物理化学条件^[24]。

相对于南海北部深水位点(Cluster IV),近岸的位点以真菌和浮游动物等异养真核生物为优势类群,这可能是由于近岸水体中丰富的有机物给异养生物提供了食物。而纤毛虫、甲藻和褐藻等则在南海北部的深水位点有较高的相对丰度,是这个海域丰富的真核生物多样性水平的主要贡献者。真核浮游生物的各个优势类群在沿海的异质性空间分布,使得它们与物理参数和地理参数的相关性非常显著(图 4)。另一方面,真核浮游生物群落的组成和多样性在近岸位点和深水位点存在显著差异,也可能部分解释水深与群落差异之间的显著正相关。Li 等^[25]和 Gong 等^[26]的研究表明,水深对于表层水体和沉积物中的微生物多样性均有影响。由于水深不可能直接影响微生物分布,Li 等^[25]和 Gong 等^[26]认为水深是作为不同位点物理化学等环境条件的综合性代表,反映水深不同的位点具有相应的生境差异。另外,海底地形在一定程度上可以影响海水的运动,而海水的运动又可以直接地影响浮游生物分布^[7]。在本研究中,表层水体中的真核浮游生物与水深的显著相关可能直接反映了沿海的物理化学及水文等条件在南北海域间的差异。

总体上,真核浮游生物群落的多样性水平自北向南有显著升高的趋势,由表 2 可见与经纬度、水深、温盐等参数的相关性。这与中国近海海域的物种丰富度自北向南递增的趋势相一致^[27]。真核生物群落差异(β -多样性)与地理距离的显著正相关,表明群落相似性随距离增加而降低。地理距离造成的群落分布差异是生物地理隔离的直接证据,而这一现象普遍存在于植物和动物群落中^[28]。在本研究中所得到的真核 ITS1 序列不仅包含浮游动物和浮游植物,也包括真菌等浮游微生物,由此可见微生物在沿海表层水体中的空间分布可能像浮游动物一样存在着生物地理限制。

本研究采集了 5 m 水深的样本并采用克隆测序的方法对真核生物类群的多样性进行定性的分析评估,仅能反映表层水体中浮游生物的物种丰度和多样性并提供数据参考。与高通量测序相比,克隆测序有测序深度上的限制因而会遗漏某些丰度较低的类群,但这并不影响其揭示生态问题^[29]。另外,ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 最初是为真菌而设计,其对真菌等一些真核类群有偏好^[30]。同样的类群偏好问题也存在于 18S rDNA 标记在环境群落中的应用中。尽管如此,ITS 和 18S rDNA 在环境群落研究中均揭示了前所未有的真核生物多样性^[31]。随着测序技术的不断变革更新,环境基因组测序会越来越多地应用到生态学研究,从而加深对环境与生物相互作用机制的理解。

4 结 论

本文利用 ITS1 序列标记对我国沿海表层水中的真核浮游生物群落多样性进行了大范围调查,研究了主要群落组成及其地理分布,并分析了生物多样性与环境参数间的关系,结果表明:

1) 大部分 ITS1 序列归属于浮游动物、真菌和囊泡虫类等真核浮游生物。在门类水平上,这些真核浮游生物可将采样位点分为 5 个大类,而每个大类的优势生物类群均在沿海位点中表现出显著的空间分布差异。

2) α -多样性指数与物理参数、地理参数有着显著的相关,并呈现自北向南的升高趋势。同时,真核浮游生物的群落相似性随着地理距离的增加而降低。因此,中国近海的真核浮游生物群落首先在主要生物组成的分布上表现出了海域空间差异,其次在生物多样性上表现出了地理限制。本文为中国近海真核浮游生物

的生物地理研究提供了分子数据基础。然而,浮游生物如何形成和维持在连续水体中的空间限制性分布,以及其分布与近海化学因素之间的关系仍需后续的深入研究。

参考文献(References):

- [1] COSTANZA R, DARGE R, GROOT R D, et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital[J]. *Ecological Economics*, 1998, 25(1): 253-260.
- [2] CROSSLAND C J, BAIRD D, DUCROTOY J P, et al. The coastal zone—a domain of global interactions[C]//CROSSLAND C J, KREMER H H, LINDEBOOM H J, et al. *Coastal Fluxes in the Anthropocene: The Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone Project of the International Geosphere-Biosphere Programme*. Berlin: Springer, 2005: 1-37.
- [3] DONG Z J, LIU D Y, KEESING J K. Jellyfish blooms in China: Dominant species, causes and consequences[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(7): 954-963.
- [4] ZHAO S J, XIAO T, LU R H, et al. Spatial variability in biomass and production of heterotrophic bacteria in the East China Sea and the Yellow Sea[J]. *Deep Sea Research Part II*, 2010, 57(11-12): 1071-1078.
- [5] ZHOU W H, LONG A M, JIANG T, et al. Bacterioplankton dynamics along the gradient from highly eutrophic Pearl River Estuary to oligotrophic northern South China Sea in wet season: Implication for anthropogenic inputs[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(4): 726-733.
- [6] DE VARGAS C, AUDIC S, HENRY N, et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean[J]. *Science*, 2015, 348(6237): 1261605.
- [7] ZHENG Z Z, ZHENG S Y. An attempt at a preliminary delineation of the geographic regions of planktonic foraminifera of the Yellow Sea, the East China Sea and adjacent waters[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1963, 5(3): 207-214. 郑执中, 郑守仪. 黄、东海及邻近水域浮游有孔虫地理区划的初步探讨[J]. *海洋与湖沼*, 1963, 5(3): 207-214.
- [8] WANG X C, LIU C, HUANG L, et al. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(3): 573-586.
- [9] BAZZICALUPO A L, BÁLINT M, SCHMITT I. Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities[J]. *Fungal Ecology*, 2013, 6(1): 102-109.
- [10] SU J L. Circulation dynamics of the China Seas north of 18°N[J]. *The Sea*, 1998(11): 483-505.
- [11] CHEN C A. Chemical and physical fronts in the Bohai, Yellow and East China seas[J]. *Journal of Marine Systems*, 2009, 78(3): 394-410.
- [12] JING Z Y, QI Y Q, HUA Z L, et al. Numerical study on the summer upwelling system in the northern continental shelf of the South China Sea[J]. *Continental Shelf Research*, 2009, 29(2): 467-478.
- [13] URAKAWA H, MARTENS-HABBENA W, STAHL D A. Stahl, high abundance of ammonia-oxidizing Archaea in coastal waters, determined using a modified DNA extraction method[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2129-2135.
- [14] GAO Y, LI F C, JIANG P, et al. Study of eukaryotic diversity in cold seep sediment of the Okhotsk Sea[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(5): 29-33. 高远, 李富超, 姜鹏, 等. 鄂霍次克海冷泉沉积物真核生物多样性的初步研究[J]. *海洋科学*, 2012, 36(5): 29-33.
- [15] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[C]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [16] BENGTTSSON-PALME J, RYBERG M, HARTMANN M, et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4(10): 914-919.
- [17] KATO H, STANDLEY D M, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-80.
- [18] GUINDON S, DUFAYARD J F, LEFORT V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *Systematic Biology*, 2010, 59(3): 307-321.
- [19] SCHLOSS P D, HANDELSMAN J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [20] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [21] LEGENDRE P, LEGENDRE L F. *Numerical ecology*[M]. Amsterdam: Elsevier, 2012.

- [22] R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing[M].Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008.
- [23] HU J Y, KAWAMURA H, HONG H S, et al. A review on the currents in the South China Sea: Seasonal circulation, South China Sea warm current and Kuroshio intrusion[J]. *Journal of Oceanography*, 2000, 56(6): 607-624.
- [24] YIN K D, QIAN P Y, WU M C S, et al. Shift from P to N limitation of phytoplankton growth across the Pearl River estuarine plume during summer[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 221: 17-28.
- [25] LI J L, LI N, LI F C, et al. Spatial diversity of bacterioplankton communities in surface water of northern South China Sea[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113014.
- [26] GONG J, SHI F, MA B, et al. Depth shapes alpha-and beta-diversities of microbial eukaryotes in surficial sediments of coastal ecosystems[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3722-3737.
- [27] LIU R Y. Progress of marine biodiversity studies in China seas[J]. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 614-626. 刘瑞玉, 中国海物种多样性研究进展[J]. *生物多样性*, 2011, 19(6): 614-626.
- [28] MARTINY J B, BOHANNAN B J, BROWN J H, et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(2): 102-112.
- [29] JONES R T, ROBESON S M, LAUBER C L, et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 442-453.
- [30] BELLEMAIN E, CARLSEN T, BROCHMANN C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases[J]. *BMC Microbiology*, 2010(10): 189.
- [31] BACHY C, DOLAN J R, LOPEZ-GARCIA P, et al. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(2): 244-255.

Biodiversity of Planktonic Eukaryotes in Surface Water of Chinese Coastal Seas Revealed by ITS Sequencing

YU Shu-xian^{1,2}, LI Wen-jun^{1,2}, LI Nan³, LI Fu-chao⁴, WANG Yin-chu¹, LI Jia-lin¹, QIN Song¹

(1. *Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;*

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Environmental Evolution and Resource Utilization of North Bay, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001, China;

4. Office of Research and Technology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Planktonic communities in surface water play an important roles in the biogeochemical processes, and the biogeographic distribution is usually related to the environmental conditions such as hydrology. Recently, molecular approaches have become major solutions to investigate eukaryotic community in the marine ecosystem. In this study, ITS1 was used as a DNA marker to estimate diversity of eukaryotic plankton in the surface water of the Chinese coastal waters. Results of BLAST indicated that most of the ITS1 sequences were affiliated with six eukaryotic groups, including Metazoa, Fungi and Alveolata. The abundant eukaryotic plankton could classify the sampling sites into five distinct clusters. For each cluster, the dominant phyla exhibited significant geographic variation. Generally, diversity of eukaryotic plankton was significantly related to longitude, latitude, depth, temperature and salinity, presenting a general increasing tendency from the north to south of coastal seas. Community dissimilarity of eukaryotes (β -diversity) increased with the increasing geographic distance. These results indicate that the eukaryotic plankton were subject to the geographical limits in the surface water of the Chinese coastal seas. Hereby this study provides molecular data for the biogeographic distribution of eukaryotic plankton along the coast of China.

Key words: eukaryotic plankton; Chinese coastal seas; ITS; biodiversity

Received: March 13, 2017